

INCIDENCIA DE *CLOSTRIDIUM DIFFICILE* Y OTROS AGENTES EN PACIENTES CON DIARREA

M.L. Herrera H. *, H. Bolaños **, P. Rivera M. *, M. Morales A. *, J. Guevara R. *

Key Words Index: Clostridium difficile, diarrhoea, incidence, children.

RESUMEN

Se pretende evaluar si el *Clostridium difficile* es un agente productor de diarrea, para lo cual se investigó las heces de 95 niños con diarrea y 26 sin diarrea, atendidos en el Hospital Nacional de Niños "Dr. Carlos Sáenz Herrera", San José, Costa Rica. El estudio tuvo una duración de 4 meses. Simultáneamente, se hizo un estudio sobre otros agentes etiológicos en estas excretas. *C. difficile* se aisló en un 8.4 por ciento en niños con diarrea y en un 7.7 por ciento en muestras normales. La mayor incidencia fue para *Campylobacter fetus sp. jejuni* con un 25.8 por ciento en muestras diarreicas y un 3.8 por ciento en niños sin diarrea, seguidamente se ubicó *Escherichia coli enteropatógena* con 8.4 y 3.8 por ciento en niños con y sin diarrea respectivamente. Se discuten los aspectos clínicos y de laboratorio de los niños que cultivaron *C. difficile*. Se concluye que puede ser un agente productor de diarrea, pero que hacen falta más estudios sobre este tema.

Descriptores: *Clostridium difficile*, diarrea, incidencia, niños. [Rev. Cost. Cienc. Méd. 1986; 7(3):287-291

INTRODUCCIÓN

El *Clostridium difficile* es un bacilo anaeróbico, productor de toxina, que ha sido considerado como causante de diarrea y colitis pseudomembranosa, posterior a la ingesta de antibióticos (1,2,3,4,12,14). Además, ha sido encontrado produciendo colitis pseudomembranosa sin relación con antibióticos, con presentación clínica indistinguible de la descrita clásicamente (18).

Se ha postulado que el factor principal para la proliferación del *C. difficile* es un cambio en la flora intestinal, que puede deberse a la presencia, ya sea de un antibiótico o de una diarrea

por otro patógeno entérico como *Yersinia sp*, *Shigella sp*, *Salmonella sp*, *Campylobacter fetus ssp. jejuni* (CFJ) o rotavirus (9).

Gilligan y colaboradores (10), informaron que la frecuencia relativa de *C. difficile* en pacientes con diarrea fue de 12 por ciento, de los cuales la mayor parte fue tratada previamente con antibióticos.

Son pocos los estudios realizados en Costa Rica con este germen. Se ha reportado un caso de diarrea severa después de tratamiento con ampicilina (12) y otro de aislamiento en sangre y heces de un niño que murió por una enterocolitis aguda necrotizante (13).

En este estudio, se pretende evaluar si *C. difficile* es un agente productor de diarrea, analizar su incidencia y las características de los niños en quienes se cultive *C. difficile*

MATERIAL Y MÉTODOS

El estudio se basó en 121 muestras de heces, recolectadas de niños menores de 2 años, que acudieron al Servicio de Emergencias Médicas del Hospital Nacional de Niños "Dr. Carlos Sáenz Herrera", San José, Costa Rica, los días lunes y martes, entre febrero y mayo de 1983. De estas 121 muestras, 95 eran de niños con diarrea y 26 sin diarrea. Se definió diarrea como la presencia de heces con mayor contenido de líquido y que excedieran 3 veces el número de excretas diarias normales para el paciente. Los 26 niños sin diarrea, tenían edades similares al grupo en estudio y acudieron a consulta, los mismos días antes mencionados, por problemas diferentes a la diarrea.

La recolección de las muestras la realizó una sola persona, directamente de las excretas; de no ser posible se recolectó usando un hisopo rectal.

Se buscó las siguientes bacterias: *Shigella sp*, *Salmonella sp*, *Escherichia coli enteropatógena* (ECEP), *Campylobacter fetus ssp. jejuni* (CFJ) y *Clostridium difficile*.

La búsqueda e identificación de *Shigella sp*, *Salmonella sp*, y ECEP, se hizo según técnicas convencionales (8). El CFJ, se aisló en el agar Butzler (6), incubado a 42°C por 72 horas en

* Laboratorio Clínico, Hospital Nacional de Niños, San José, Costa Rica.

** Instituto Nacional de Investigación en Salud (INISA), Universidad de Costa Rica, San José, Costa Rica.

CUADRO 1
PORCENTAJE DE AISLAMIENTO EN 95 MUESTRAS DIARREICAS Y 26 CONTROLES
Febrero - Mayo, 1983

Bacteria	Con diarrea		Sin diarrea	
	Nº	%	Nº	%
- <i>Campylobacter fetus</i> ssp. jejuni	24	25.3	1	3.8
- <i>Escherichia coli</i> enteropatógena	8	8.4	1	3.8
- <i>Clostridium difficile</i> *	8	8.4	2	7.7
- <i>Clostridium perfringens</i>	2	2.1	—	—
- <i>Shigella</i> sp.	2	2.1	—	—
TOTAL	44	46.3	4	15.4

* Diferencia estadísticamente significativa p< 0.05.

una jarra de Brewer sin catalítico con un sobre de Gas-Pack. (BBL, Cockneyville, Md, 21030, USA).

Se identificó según las técnicas descritas por Stribert (16). Para el *C. difficile*, las muestras se rayaron en cefalotina penicilina-fructosa-agar (CPFA) (11,12), el que se incubó por 48-72 horas en atmósfera anaeróbica usando GasPack. En dicho medio, se buscó colonias pequeñas, con borde filamentosos, fluorescencia dorada (con Lámpara de Wood) y que fueran lipasa y lecitinasa negativa. Este tipo de colonias producen un viraje del indicador del medio de cultivo alrededor de la colonia a amarillo (11,12). A las colonias con estas características, se les hizo una tinción de Gram, movilidad a gota pendiente, producción de indol, crecimiento en bilis al 20 por ciento, hidrólisis de la esculina y fermentación de carbohidratos en peptona-extracto de levadura (PY) (11,12).

Todas las heces se guardaron a 70°C y se investigó la presencia de rotavirus, por la técnica de ELISA (17), en los pacientes que cultivaron *C. difficile*. Para la búsqueda de eritrocitos y leucocitos en heces, se hizo una suspensión en solución salina y se observó al microscopio de luz.

RESULTADOS

Como se observa en el Cuadro 1, la mayor incidencia fue para CFJ, seguido por ECEP y *C. difficile*. Se aisló una *Shigella sonnei* y una *Shi-*

CUADRO 2
DOBLES ETIOLOGÍAS
EN 95 CASOS CON DIARREA
Febrero - Mayo, 1983

Agentes	Número de casos
- <i>C. fetus</i> jejuni + <i>C. difficile</i>	4
- <i>C. fetus</i> jejuni + <i>E. coli</i> enteropatógena	1
- <i>C. fetus</i> jejuni + <i>S. sonnei</i>	1
- <i>C. difficile</i> + rotavirus	1

gella flexneri. En dos oportunidades se cultivó *Clostridium perfringens*, en ambos, el aislamiento se realizó en el medio CPFA. En las 26 muestras de los niños que no tenían diarrea, se aisló dos *C. difficile*, un CFJ y una ECEP.

De los diez niños que cultivaron *C. difficile*; ocho tenían diarrea, dos no la presentaron. Cuatro de estos diez, tenían un doble aislamiento con CFJ (Cuadro 2), dos de ellos habían recibido recientemente ampicilina, a dosis desconocida. A estos diez casos, se les realizó la prueba de ELIZA para rotavirus, con solo un resultado positivo.

En tres niños con diarrea, se aisló el *C. difficile* como único agente.

Los dos niños sin diarrea, que cultivaron *C. difficile*, no presentaron ningún síntoma, y este se

aisló en baja cantidad.

En el Cuadro 3, se resume los aspectos importantes de los 8 pacientes con diarrea y cultivo positivo por *C. difficile*. Todos estaban deshidratados y su rehidratación fue difícil; ésta se hizo por gastroclísis en cinco casos, dado el número de deposiciones por día, la abundancia de estas y la cantidad de vómitos. Tres de ellos requirieron hospitalización, con una estancia promedio de 8.3 días. Todos los niños tuvieron un aumento importante en la temperatura corporal y uno de ellos convulsionó. Su edad promedio fue de 7 meses.

En el Cuadro 4, se presentan los resultados de la observación microscópica de las heces para buscar leucocitos, eliminando las dobles etiologías.

CUADRO 3

CARACTERÍSTICAS DE LAS HECES DE 8 NIÑOS CON DIARREA Y CULTIVO POSITIVO POR *DIFFICILE*
Febrero - Mayo, 1983

Caso	Leucocitos	Guayaco	Consistencia	Deposic/día	C. difficile y rotavirus		CFJ ¹
1 ^x	++++	+	Grumosa	7	-		+
2	++++	-	líquida	18	+		-
3	++	-	grumosa	4	-		+
4	-	-	líquida	12	-		-
5	-	-	"	7	-		-
6 ^x	++++	+	"	17	-		+
7	++	+	"	10	-		+
8	++	-	"	15	-		-

¹ *Campylobacter fetus* ssp. jejuni

^x Diarrea crónica.

CUADRO 4

LEUCOCITOS EN HECES MUESTRAS CON Y SIN DIARREA *
Febrero - Mayo, 1983

Bacteria	Con diarrea			Sin diarrea			
	Leuc(+)	%	Leuc(-)	%	Leuc(+)	Leuc(-)	%
- <i>C. fetus</i> jejuni	14	77.8	4	22.2	-	1	100
- <i>E. coli</i> enteropatógena	3	42.8	4	57.2	-	1	100
- <i>C. difficile</i>	1	33.3	2	66.7	-	2	100
- <i>C. perfringens</i>	2	100	-	-	-	-	-
- <i>Shigella</i> sp.	1	100	-	-	-	-	-
TOTAL DE CEPAS	21		10			4	

* Se eliminaron las dobles etiologías (13 cepas).

DISCUSIÓN

En los adultos, el papel del *C. difficile* en la colitis pseudomembranosa, asociado a la administración de antibióticos, está bien establecido (1, 2, 3, 4, 14). Este síndrome también ha sido encontrado en niños (19). Asimismo, tanto en adultos como en niños sin terapia antimicrobiana, se ha diagnosticado la colitis pseudomembranosa y se ha encontrado al *C. difficile* como agente etiológico (17,18).

Se ha relacionado a *C. difficile* con la patogénesis de la enterocolitis aguda necrozante (13, 19) con el síndrome de la muerte súbita infantil (7), con diarreas crónicas (5) y con la enfermedad inflamatoria crónica del intestino grueso (7).

Se sabe que *C. difficile* puede ser encontrado formando parte de la flora normal intestinal en neonatos e infantes, y que esta colonización se ve favorecida con la alimentación a base de fórmulas lácteas (7). En nuestro estudio, *C. difficile* fue aislado en 10 oportunidades, 8 en niños con diarrea (8.4 por ciento) y en 2 niños sin diarrea (7.7 %). En base a estos datos, se concluye que si existe una diferencia estadísticamente significativa entre la proporción de aislamiento en muestras con diarrea y sin diarrea; lo anterior con una confianza del 95 por ciento (PL 0.05). En 5 casos se le encontró formando parte de un doble aislamiento. Solo en 3 casos fue aislado en forma pura, habiéndose eliminado los otros patógenos entéricos contemplados en este estudio. Estos 3 últimos casos presentaban una diarrea moderadamente severa, solo una tenía leucocitos en heces, no fue necesario administrarles antibióticos y no fueron hospitalizados. Sus excretas eran líquidas, abundantes y frecuentes.

En la literatura se informa que la frecuencia relativa de aislamiento del *C. difficile* se incrementa con el uso de antibióticos y por la presencia de otro patógeno entérico (9, 10). En nuestra serie de casos, cuatro tenían doble aislamiento con CFJ, uno de ellos tenía también un rotavirus; por último, 2 de ellos habían recibido ampicilina. Esto parece reforzar las observaciones de los investigadores antes mencionados (9,10).

El CFJ, ocupó el primer lugar en frecuencia, con una incidencia total de 29.1 por ciento, del cual el 25.3 por ciento fue pacientes con diarrea. Estos datos colocan al CFJ, como uno de los más importantes agentes productores de diarrea, en niños menores de 2 años de Costa Rica. Como se observa en el Cuadro 4, el 77.8 por ciento de las heces con CFJ, presentan leucocitos, mientras que sólo en un 33.3 por ciento de

los casos con *C. difficile* los presentaron. A pesar del escaso número de casos con *C. perfringens*, llama la atención que en un 100 por ciento, se encontraron leucocitos en las heces. Estos 2 aislamientos de *C. perfringens* requieren un posterior estudio, dadas las posibles repercusiones futuras de este anaeróbico en cuadros diarreicos (1). El medio usado en este estudio (CPFA), no es el más indicado para aislar *C. perfringens* (1). Sin embargo, en otras oportunidades, se le ha aislado en diarreas posteriores al tratamiento en casos de meningitis (Herrera, observación no publicada).

Se obtuvo un bajo porcentaje de aislamiento de *Salmonella* sp. y *Shigella* sp., sin embargo, estos agentes continúan siendo un importante problema de salud (Herrera, observación no publicada). Los casos positivos por *C. difficile* deben ser tomados con reserva. Se necesita más información clínica y estudios etiológicos más extensos. Al encontrarse tanto en flora normal como en casos con diarrea, es difícil asegurar que esta sea la causa del cuadro diarreico (19). Sin embargo, es recomendable su estudio en aquellos pacientes con diarrea severa, en el que se haya excluido otros patógenos entéricos y principalmente, pero no exclusivamente, en quienes recibieron antibióticos. En tales casos, cuando se obtiene un cultivo positivo, se recomienda suspender la administración del antibiótico. Además, es aconsejable una endoscopia y según los hallazgos en este examen, la evolución y el cuadro clínico, debe decidirse si se requiere terapia dirigida. Los antibióticos de elección contra el *C. difficile* son la vancomicina y el metronidazol (15).

ABSTRACT

We evaluated Clostridium difficile as a diarrhoea inducing agent, in 95 diarrhoeic and 26 non-diarrhoeic stool samples. Other ethiological agents were a studied simultaneously. C. difficile was found in 8.4 percent of the diarrhoeic and in 7.7 percent of non-diarrhoeic children. The highest incidence was for Campylobacter fetus ssp. jejuni with a 25.8 percent in diarrheic and 3.8 percent in non-diarrhoeic children, followed by enteropathogenic E. coli (8.4% and 3.8% respectively). Clinical and laboratory findings of the C. difficile patients are discussed. The possibility of C. difficile being a diarrhoea agent could not be discarded, but we feel that more studies are required.

BIBLIOGRAFÍA

1. Allen S.D. Clostridium, In: Lennette, E.; Balows, A.; Hausler, W.J. JR.; Shadony H.J. editores. Manual of clinical Microbiology. Fourth edittion American Society for Microbiology, Washington DC. 1985; pág. 434-444.
2. Bartlett, J.G.; Chang T.W. Gurwith. M.; Gorbach, S.L.; Onderdonk, B. Antibiotic-associated pseudomembranous colitis due to toxin-producing Clostridia. *N. Engl. J. Med.* 1978; 298:531-534.
3. Bartlett, J.G.; Moon N.; Chang T.W.; Taylor, N.; Onderdonk, A.B. Role of Clostridium difficile in antibiotic-associated pseudomembranous colitis. *Gastroenterol.* 1978; 75:778-782.
4. Bartlett, J.G.; Chang T.W.; Dzink, J.A. Clinical and laboratory observations in Clostridium difficile colitis. *Am. J Clin. Nutr.* 1980; 33:2521-2526.
5. Brettle, R.P.; Poxton, I.R.; McMordok, J.; Brown, R.; Byrne, M.D.; Colle, J.G. Clostridium difficile in association with sporadic diarrhoea. *Br. Med. J.* 1982; 284:230-233.
6. Butzler, P.J.; M.B. Skirrow. Campylobacter enteritis. *Clin. Gastroent.* 1979; 8:737-765.
7. Cooperstock, M.S.; Steffen, F.; Yolken, R.; Onderdonk, A. Clostridium difficile in normal infant and Sudden Infant Death Syndrome: an association with formula feeding. *Pediatrics.* 1982; 70:91-95.
8. Edwards. P.R.; W.H. Ewing. Identification of Enterobacteriaceae. 3rd ed. Burgess, Pub. Co. Minneapolis, Minnesota. 1972; 412.
9. Falsen, E.; Kaijser, R.; Nehls, L; R.; Svedhen, A. Clostridium difficile in relation to enteric bacterial pathogens. *J. Clin. Microb.* 1980; 122:297-300.
10. Gilligan, P.H.; McCarthy, L.R. Genta, V.K. Relative frequency of Clostridium difficile in patiens with diarrheal disease. *J. Clin. Microbiol.* 1981; 14:26-31.
11. George, W.L.; Sutter, V.L.; Citron, D.; Finegold, S.M. Selective and differential meduin for isolation of Clostridium dif ficile. *J. Clin. Microbiol.* 1979; 9:214-219.
12. Herrera, M.L. Primer aislamiento de Clostridium difficile en heces. *Rev. Med. Hosp. Nal. Niños.* 1984; 19(1):49-56.
13. Herrera, M.L.; Rivera, P.; Guevara, J. Descripción del primer caso de enterocolitis aguda necrotizante debida a Clostridium difficile, diagnosticado en Costa Rica. *Rev. Cost. Cienc. Med.* 1986; 7(3) en prensa.
14. Larson, H.E.; Prince, A.B.; Honour, P. Clostridium difficile and the aetiology of pseudomembranous colitis. *Lancet.* May, 20 1980; 1063-1066.
15. Nelson, J.D. Pocketbook of Pediatric Antimicrobial Therapy. 3rd. ed. Hill Printing and Stationery Co. Waco. Texas 1979; 3-10.
16. Smibert, R.M. The Genus Campylobacter. *Ann. Int. Microbiol.* 1978; 32:673-712.
17. Vives, M.; Mata, L.; Castro, B.; Simhon, A.; Jiménez, P. Estudio Puriscal y Infección entérica en niños menores de dos años. *Rev. Med. Hosp. Nal. Niños.* 1982; 17:57-69.
18. Wald, A.; Mendelow, H.; Bartlett, J.G. Non-antibiotic associated pseudomembranous colitis due to toxin producing Clostridia *Ann. Int. Med.* 1980; 92:10-12.
19. Welch, D.F.; M.J. Marcks. Is Clostridium difficile pathogenic in infants? *J. Pediat.* 1982; 100:393-395.